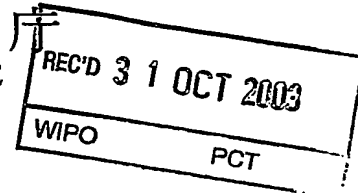


Rec'd PCT/PTC 08 APR 2005

PCT 03/13000

09.10.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年10月11日

出願番号
Application Number: 特願2002-299199
[ST. 10/C]: [JP 2002-299199]

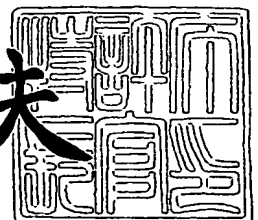
出願人
Applicant(s): サントリー株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 1024768

【提出日】 平成14年10月11日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12P 7/64

【発明の名称】 不ケン化物の含量を低下させた微生物油脂の製造法並びに該油脂

【請求項の数】 22

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-1006

【氏名】 秋元 健吾

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-602

【氏名】 東山 堅一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市真上町 6-11-1-113

【氏名】 河島 洋

【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市伊勢田町毛語 100

【氏名】 角田 元男

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【包括委任状番号】 9909459

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 不ケン化物の含量を低下させた微生物油脂の製造法並びに該油脂

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油の製造方法において、不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂を産生しうる微生物を、窒素源濃度2～15%の培地で、攪拌翼直径(=d)と培養槽内径(D)との比率が $d/D=0.30\sim0.6$ である攪拌翼を装備した培養槽内で、培養することを特徴とする方法。

【請求項2】 前記攪拌翼直径(=d)と培養槽内径(D)との比率が、 $d/D=0.34\sim0.6$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記窒素源が、pH5以下の条件で殺菌した窒素源を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の方法により得られた粗油を精製することを特徴とする精製油脂の製造方法。

【請求項5】 前記高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂の組成がトリグリセリド70%以上であることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油の製造方法、又は請求項4に記載の精製油脂の製造方法。

【請求項6】 前記油脂を構成する高度不飽和脂肪酸が γ -リノレン酸(18:3 ω 6)、ジホモ- γ -リノレン酸(20:3 ω 6)、アラキドン酸(20:4 ω 6)、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸(22:4 ω 6)、4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸(22:5 ω 6)、 α -リノレン酸(18:3 ω 3)、6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸(18:4 ω 3)、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸(20:4 ω 3)、エイコサペンタエン酸(20:5 ω 3)、7,10,13,16,19-ドコサペキサエン酸(22:5 ω 3)、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(22:6 ω 3)、6,9-オクタデカジエン酸(18:2 ω 9)、8,11-エイコサジエン酸(20:2 ω 9)若しくは5,8,11-エイコサトリエン酸(ミード酸: 20:3 ω 9)又はこれらの組み合わせである、請求項1～5の

いずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 前記微生物が、モルティエレラ (Mortierella) 属、コニディオボラス (Conidiobolus) 属、フィチウム (Pythium) 属、フィトフトラ (Phytophthora) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、クロドスポリウム (Cladosporium) 属、ムコール (Mucor) 属、フザリウム (Fusarium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、ロードトルラ (Rhodotorula) 属、エントモフトラ (Entomophthora) 属、エキノスポランジウム (Echinosporangium) 属、サプロレグニア (Saprolegnia) 属に属する微生物である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記微生物がモルティエレラ属のモルティエレラ亜属に属する微生物である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 前記モルティエレラ亜属に属する微生物がモルティエレラ属アルピナ種である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により得られる、不ケン化物含量が2.2重量%以下であることを特徴とする粗油。

【請求項11】 請求項10に記載の粗油を精製して得られる精製油脂。

【請求項12】 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により得られる、エステル型ステロール含量が1.0重量%以下であることを特徴とする粗油。

【請求項13】 請求項12に記載の粗油を精製して得られる精製油脂。

【請求項14】 不ケン化物含量が2.2重量%以下であることを特徴とする油脂中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る粗油。

【請求項15】 前記請求項の粗油を精製して得られる精製油脂。

【請求項16】 エステル型ステロール含量が1.0重量%以下であることを特徴とする油脂中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る粗油。

【請求項17】 請求項16に記載の粗油を精製して得られる精製油脂。

【請求項18】 請求項10～17のいずれか1項に記載の粗油及び／又は精製油脂を配合してなる一般飲食物、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製

乳、成熟児用調製乳、乳幼児食品、妊産婦用食品又は老人用食品。

【請求項 19】 請求項 10～17 のいずれか 1 項に記載の粗油及び／又は精製油脂を、場合によっては経口、腸内又は非経口投与に適した中性の担体と共にを配合した治療用栄養食品。

【請求項 20】 請求項 10～17 のいずれか 1 項に記載の粗油及び／又は精製油脂を配合した、動物用飼料又は養魚用飼料。

【請求項 21】 請求項 10～17 のいずれか 1 項に記載の粗油及び／又は精製油脂を配合した医薬組成物。

【請求項 22】 請求項 10～17 のいずれか 1 項に記載の粗油及び／又は精製油脂を原料として得られる医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る粗油及び精製油脂の製造方法、さらには該油脂（粗油又は精製油脂）並びに該油脂（粗油又は精製油脂）を配合してなる飲食物、治療用栄養食品、飼料及び医薬品に関するものである。本発明において、「不ケン化物」及び「エステル型ステロール」とは、微生物から抽出されたものをいう。従って本発明の「不ケン化物」及び「エステル型ステロール」は、後から粗油に添加したものを含まない。

【0002】

【従来の技術】

ヒトの高度不飽和脂肪酸（以下「PUFA」を称する）の生合成には、代表的な二つの系列、 ω 3系と ω 6系があり（ ω とは、脂肪酸のメチル基末端から数えて最初の二重結合がある炭素数までの数を示している）、例えば ω 6系の場合は、リノール酸（18:2 ω 6）から、不飽和化と炭素鎖長延長が繰り返されて、 γ -リノレン酸（18:3 ω 6）、ジホモ- γ -リノレン酸（20:3 ω 6）、アラキドン酸（20:4 ω 6）及び4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸（22:5 ω 6）へと変換される。

【0003】

同様に ω 3系の場合は、 α -リノレン酸(18:3 ω 3)から、不飽和化と炭素鎖長延長が繰り返されて、エイコサペンタエン酸(20:5 ω 3)、7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸(22:5 ω 3)及び4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(22:6 ω 3)へと変換される。 ω 3系のPUFAとして、エイコサペンタエン酸(以下「EPA」と称する)、ドコサヘキサエン酸(以下「DHA」と称する)は、特に、動脈硬化症、血栓症などの成人病の予防効果や抗ガン作用、学習能の増強作用などで多くの生理機能を有していることが知られ、医薬品、特定保健用食品への利用で様々な試みがなされている。しかし、最近では ω 3系以外のPUFA(ω 6系及び ω 9系)の生理機能にも注目が集っている。

【0004】

アラキドン酸は、血液や肝臓などの重要な器官を構成する脂肪酸の約10%程度を占めており(例えば、ヒト血液のリン脂質中の脂肪酸組成比では、アラキドン酸は11%、エイコサペンタエン酸は1%、ドコサヘキサエン酸は3%)、細胞膜の主要構成成分として膜の流動性の調節に関与し、体内の代謝で様々な機能を示す一方、プロスタグランジン類の直接の前駆体として重要な役割を果たす。

【0005】

特に最近では、乳幼児栄養としてのアラキドン酸の役割、神経活性作用を示す内因性カンナビノイド(2-アラキドノイルモノグリセロール、アナンダミド)の構成脂肪酸として注目されている。通常はリノール酸を富む食品を摂取すればアラキドン酸に変換されるが、成人病患者やその予備軍、乳児、老人では生合成に関与する酵素の働きが低下し、これらアラキドン酸は不足しがちとなるため、油脂(トリグリセリドの構成脂肪酸)として、直接に摂取することが望まれる。

【0006】

ω 3系のPUFAであるEPAやDHAには、魚油という豊富な供給源が存在するが、 ω 6系のPUFAである γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸及び4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸(22:5 ω 6)は、従来の油脂供給源から殆ど得ることができず、現在では微生物を発酵して得たPUFAを構成脂肪酸として成る油脂(トリグリセリド)が一般に使用されている。例えば、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂(トリグリセリド)を産生することのできる種々の微生物を培養

して、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）を得る方法が提案されている。

【0007】

この中でも、特にモルティエラ属の微生物を用いることによって、アラキドン酸高含有油脂（トリグリセリド）が得られることが知られている（特開昭63-4891、特開昭63-12290）。しかし、これら油脂は膨大な試験結果から安全性が高いと言われながらも微生物起源という問題により食経験が少なく、まだ世間一般に十分浸透するには至っていない。なお、アラキドン酸が必須の用途、例えば、乳幼児栄養の分野、具体的には調製乳に発酵で得たアラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）が使われ始めてきている。

【0008】

動植物などの天然物から得た油脂は、脱ガム、脱酸、脱臭、脱色、分子蒸留、ウインタリングなどの各精製工程を経て食用油脂として市販される。例えば油糧性植物から圧搾して得た油脂は不純物が多くそのまま食用油脂として使用することは出来ない（伝統的に食してきたごま油やオリーブ油を除き、一般に精製して食用油として使用する）。

【0009】

そこで、例えば、脱ガム工程で未精製油に含まれるリン脂質、炭水化物、樹脂、蛋白質化合物、微量金属、色素を取り除き、脱酸（アルカリ精製）工程で脂肪酸、色素、リン脂質、微量金属、硫黄化合物、油不溶物、酸化生成物を取り除き、脱色工程で色素、ガム質、微量金属、石鹸分、酸化生成物、リン脂質を取り除き、脱臭工程で脂肪酸、モノグリセリド、ジグリセリド、アルデヒド、アルコール、ケトン、炭化水素、色素、硫黄化合物、過酸化物、酸化分解物、その他にいい成分を取り除く。

【0010】

油脂中には、不ケン化物と呼ばれる油溶性でアルカリで分解しにくい有機化合物が含まれており、例えば、高級アルコール、ステロール、炭化水素、トコフェロール、カロテノイドなどの化合物が不ケン化物の構成成分として知られている。油脂の精製工程で不ケン化物含量を低減できるが完全に除去することはできない。

い。ステロール類は、微生物が産生する油脂の不ケン化物の主たる成分として存在することが知られている。

【0011】

そして、油脂中のステロール類には遊離型とエステル型が存在し、精製工程で遊離型は除去することができるが、エステル型はほとんど除去することができない（例えば、脱ガム、脱酸、脱色、脱臭の各工程において、大豆油中のステロール類含量（mg/g）は、遊離型の場合は3.4、3.0、2.0、1.6となり、エステル型の場合は0.6、0.6、0.6、0.6となる（「食用油脂の科学」P20-21、（株）幸書房）。

【0012】

不ケン化物の一部として、取り除くことの出来ないステロール類などが含まれていることから、不ケン化物含量は精製油脂の品質の指標として、あるいは精製工程の管理指標として広く一般に使われている。例えば、日本農林規格では、食用サフラワー油、食用大豆油、食用パーム油などの不ケン化物含量は1.0%以下と定められている（昭和44年3月31日農林省告示第523号）。乳幼児にはコレステロールが必要でコレステロールを強化した調製乳が市販されているが、植物性食用油脂には植物由来のステロール類が含まれており、この植物由来のステロール類の存在により乳幼児のコレステロール吸収が阻害されという問題がある（食品と開発，Vol.33, No.2, P.42-45（1998））。したがって、調製乳に配合する用途を考えた場合、ステロール類の少ない油脂、つまり不ケン化物が低い食用油脂が強く望まれている。

【0013】

モルティエラ属の微生物を培養して得られる油脂は、その大部分がトリグリセリド（約70重量%以上）及びリン脂質であり、この他に不ケン化物が含まれており、不ケン化物の主な構成成分はデスモステロール等のステロールおよびステロールエステルである。食用油脂の形態はトリグリセリドであり、微生物を培養して得られたオリジナルの油脂（菌体から抽出操作によって得た油脂であって、「粗油」と称する）を食用油脂の精製工程（脱ガム、脱酸、脱臭、脱色）を経ることで、リン脂質を取り除いた精製油脂を得ることができるが、不ケン化物を精

製工程で完全に取り除くことは難しい。

【0014】

完全除去が難しいこと、そして不ケン化物が低い食用油脂が広く望まれている背景理由から、不ケン化物の除去法について検討が成され、カラムクロマト法による精製法が発明されている（特開平10-191886）。しかし、該発明では、不ケン化物の構成成分についての詳細な検討を行なっておらず、不ケン化物の構成成分が精製前後でどのように変化したのか、即ち、精製によって除去された成分はどのような化合物であるのかに関しては不明である。

【0015】

モルティエラ属の微生物を培養して得られる油脂は、菌糸内に蓄積されるため、高度不飽和脂肪酸含有油脂生産の経済化を図るためには、菌体がより高濃度となる培養を行なう必要がある。菌体が高濃度となるためには、菌体成分へと変換される培地窒素源を高める必要がある。従来の報告（特開平10-191886、特開平10-70992）では、不ケン化物あるいは総ステロールの含量について報告されているものの、微生物培養で用いた培地の窒素源濃度はせいぜい1.5%程度までである。

【0016】

また、ステロール含量が1%以下である高度不飽和脂肪酸含有油脂が報告（特表2000-510513）されているが、その製造で使用された培地の窒素源濃度は低く、モルティエラ・アルピナによるアラキドン酸油脂の生産では窒素源濃度1%（=酵母エキス 0.5%+ NaNO_3 0.5%）の低濃度で培養されている（特表2000-5088）。このように、不ケン化物およびステロール類が低い食用油脂が広く望まれている背景理由から、不ケン化物および／又はステロール類を低減するための検討が成されているものの、微生物の高濃度培養によって得られた微生物油脂の不ケン化物やステロール類に関する報告は無い。

【0017】

先にも述べたように、不ケン化物の主たる成分であるステロール類には遊離型ステロールとエステル型ステロールが存在し、精製工程で遊離型ステロールは除去できるが、エステル型ステロールは精製工程で殆ど除去できない。したがって

、不ケン化物、具体的にはステロール類含量の低い精製油脂を得るためには、精製工程で除去することが困難であるエステル型ステロールの含量を低下せしめた精製原料、即ち、エステル型ステロールの含有量の低い粗油を開発することが重要であると考えられる。

【0018】

【特許文献1】

特開昭63-44891公報

【特許文献2】

特開昭63-12290公報

【特許文献3】

特開平10-191886号公報

【特許文献4】

特開平10-70992公報

【特許文献5】

特表2000-508888号公報

【特許文献6】

特表2000-510513号公報

【特許文献7】

特開平6-153970号公報

【0019】

【非特許文献1】

食用油脂の科学 P20-21、(株)幸書房

【非特許文献2】

食品と開発, Vol.33, No.2, P.42-45 (1998)

【0020】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油の製造方法を提供する。本発明はまた、前記の粗油から精製油を製造する方法を提供する。

本発明は更に、上記の方法により得ることが出来る、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油、及びこの油脂から得られる精製された油脂を提供する。

本発明はまた、前記の油脂の種々の使用方法を提供する。

【0021】

【課題を解決するための手段】

不ケン化物含量およびステロール類含量を低減した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂は既に報告（特開平10-191886、特開平10-70992、特表2000-510513）されているが、これらの製造法は、培養の培地窒素源濃度が低いため経済生産するには適していない。そこで、培地窒素源濃度を高めて培養することによって、培養1回当たりの高度不飽和脂肪酸含有油脂の回収量向上を図り経済性を高めたが、一方で、油脂中の不ケン化物含量およびステロール類含量も上昇することも分かった。そこで、高濃度培養による経済性の向上と、不ケン化物およびステロール類含量低減による品質の向上の両方を満たす製造法の開発を課題とした。

【0022】

本発明者等は、高濃度培養で得られた油脂中、具体的には粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量が低下した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（粗油）を提供する目的で、高濃度の窒素源を含む培地で、培養条件と得られる油脂の組成について鋭意研究した結果、驚くべきことに、培養槽の攪拌翼形状の改善や、培地窒素源の殺菌pH条件の改善によって、油脂（粗油）に対する不ケン化物含量が2.2重量%以下及び／又はエステル型ステロール含量が1.0重量%以下である高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂（粗油）の製造法を得た。

【0023】

液体培養法による微生物を用いた高度不飽和脂肪酸生産においては、充分な酸素を供給することが重要であることが知られている（特開平6-153970）。微生物の液体培養における酸素供給の指標として、酸素移動容量係数(kLa)が広く用いられており、RichardはkLaが、単位液量当りの攪拌所要動力(Pg/V)、通気線速度

(Vs)、攪拌回転数(N)との間に(1)式に示す関係のあることを報告(J. W. Richard; Prog. Ind. Microbiol., vol.3, p.141, (1961))している。

$$kLa \propto (Pg/V)^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5} \quad (1)$$

【0024】

福田らは、0.2~60m³容の培養槽の実測値より、(1)式よりも(2)式の方が良い相関が得られることを報告(福田ら; 醗酵工学会誌, vol.46, p.829 (1968))している。

$$kLa \propto \{(Pg/V)^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5}\}^{1.4} \quad (2)$$

松島らは(1)(2)式の普遍性を検証し、(3)式のように一般化することにより幅広く成立することを報告(松島ら; 醗酵工学会誌, vol.50, p.105 (1972))している。

$$kLa \propto \{(Pg/V)^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5}\}^\alpha \quad (3)$$

【0025】

これら相関式より、同一攪拌所要動力(Pg/V)および同一通気線速度(Vs)の条件下においては、より高い攪拌回転数(N)で操作した方が高い酸素移動容量係数(kLa)が得られると考えられる。

単位液量当り攪拌所要動力は、液密度(ρ)、動力数(Np)、攪拌翼直径(d)との間で(4)式で示される。

$$Pg/V = \rho N_p^3 d^5 / V \quad (4)$$

ある一定の仕事量、即ち同一攪拌所要動力で、より高い攪拌回転数(N)で操作するためには、より小さな動力数(Np)および小さな攪拌翼径(d)を有する培養槽を用いたほうが有利であることが考えられる。

【0026】

また、田口ら(微生物学基礎講座7-微生物培養工学-、田口久治および永井史郎編集、共立出版社1985年、p.175)によれば通気攪拌培養槽の標準条件として、d/D比の標準的範囲は1/4~1/3であり典型値は1/3であると述べられている。

しかし、ここで示した従来の考え方は、水あるいは菌体濃度の低い培養液において成立する考察である。製造の経済性を向上させるためには、培地の窒素源濃度を上げ、より高い菌体濃度にしなければならないため、菌体濃度の高い培養液

においては、酸素移動容量係数(kLa)だけでなく培養液の全体混合も考慮しなければならないと発明者らは考えた。

【0027】

また、培地の窒素源濃度を上げ、より高い菌体濃度で培養した場合、微生物より抽出した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂（粗油）に含まれる不ケン化物含量およびエステルステロール含量が増加する結果がえられ、培養を高濃度化したために望ましくない組成の油脂になることが分かった。岩本は菌体中の油脂含量が増すにつれて、全脂質中の不ケン化物含量の含有割合が減少すると報告（“微生物による油脂の生産” 岩本浩明（出展不明））している。発明者らの検討においても、より高濃度で培養すると菌体当たり油脂含量が低下する傾向が認められたが、この菌体当たり油脂含量が低下したことが、不ケン化物含量およびエステルステロール含量の増加を引き起こしたものと考えた。

【0028】

そこで、培地窒素源濃度の高い高濃度培養において、酸素移動容量係数(kLa)だけでなく培養液の全体混合を改善し、菌体当たり油脂含量をより高めることが重要であると発明者らは考えた。そして、その手段として、攪拌翼形状を改良することに着目し鋭意検討を重ねた。その結果、攪拌翼直径(d)、培養槽内径(D)の比率が、 $d/D=0.34\sim0.6$ の培養槽を用いて培養することにより、菌体当たりの油脂含量を高め、微生物の高度不飽和脂肪酸の生産性を改善することに成功したが、さらに驚くべきことに微生物より抽出した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂に含まれるエステルステロール含量が著しく低下していることが分かった。

【0029】

そしてさらに、 d/D が0.34未満の培養槽であっても、培地窒素源をpH5.0以下で殺菌することによって、微生物の高度不飽和脂肪酸の生産性を改善しエステルステロール含量を低減させることが分かった。

そこで、発明者らは鋭意検討を重ねた結果、 $d/D=0.34$ 以上の攪拌翼を装備した培養槽を用いて培養する方法か、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽でもpH5以下で殺菌した培地窒素源を含む培地で培養する方法を採ることによって、油脂中、具

体的には粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量が低下した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（粗油）の安定生産に成功し、本発明を完成するに至った。

【0030】

従って、本発明は、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油の製造方法において、不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂を産生しうる微生物を、窒素源濃度2～15%の培地で、攪拌翼直径(=d)と培養槽内径(D)との比率が $d/D=0.30\sim0.6$ である攪拌翼を装備した培養槽内で、培養することを特徴とする方法を提供する。

本発明はまた、前記の方法により得られる、不ケン化物含量が2.2重量%以下であることを特徴とする粗油を提供する。本発明は更に、上記の粗油を精製して得られる精製油脂を提供する。

【0031】

本発明は更に、前記の粗油及び／又は精製油脂を配合してなる一般飲食物、機能性食品、栄養補助食品、未熟児用調製乳、成熟児用調製乳、乳幼児食品、妊産婦用食品又は老人用食品を提供する。

本発明はまた、前記の粗湯及び／又は精製油脂を、場合によっては経口、腸内又は非経口投与に適した中性の担体と共にを配合した治療用栄養食品を提供する。

本発明は更に、前記の粗油及び／又は精製油脂を配合した、動物用飼料又は養魚用飼料を提供する。

本発明はまた、前記の粗油及び／又は精製油脂を配合した医薬組成物を提供する。本発明は更に、前記の粗油及び／又は精製油脂を原料として得られる医薬組成物を提供する。

【0032】

【発明の実施の形態】

本発明は、油脂中、具体的には粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量が低下した高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（粗油）の製造方法、さらに該油脂（粗油）並びに該油脂（粗油）を精製した得た精製油脂

(トリグリセリド)を配合して成る飲食物、治療用栄養食品、飼料及び医薬品に関するものである。

【0033】

本発明の油脂(粗油)は、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂(トリグリセリド)を産生しうる微生物を窒素源濃度2%~15%の培地で培養し、その培養物から得られる微生物油脂であって、 $d/D=0.34\sim 0.6$ の攪拌翼を装備した培養槽を用いて培養するか、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽の場合はpH5以下で殺菌した窒素源を含む培地で培養することにより、粗油中の不ケン化物及び/又はエステル型ステロール含量を低下させたものである。

【0034】

具体的には、油脂(粗油)に対して不ケン化物含量が2.2重量%以下、好ましくは2.0重量%以下、より好ましくは1.8重量%以下であり及び/又はエステル型ステロール含量が1.0重量%以下、好ましくは0.8重量%以下、より好ましくは0.6重量%以下であり、しかも、油脂(粗油)中の総脂肪酸に対する高度不飽和脂肪酸を10%重量%以上、好ましくは20重量%以上、より好ましくは30重量%以上、最も好ましくは40重量%以上含有する。したがって、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂(トリグリセリド)を産生しうる微生物を培養することが必須である。

【0035】

ここでいう微生物としては、炭素数が18以上で二重結合は3以上の $\omega 6$ 系高度不飽和脂肪酸、炭素数が18以上で二重結合が2以上の $\omega 9$ 系高度不飽和脂肪酸、及び炭素数が18以上で二重結合が3以上の $\omega 3$ 系高度不飽和脂肪酸の少なくとも1種の高度不飽和脂肪酸を主にトリグリセリドの構成脂肪酸として産生する微生物が望ましい。

【0036】

そして、炭素数が18以上で二重結合は3以上の $\omega 6$ 系高度不飽和脂肪酸としては、 γ -リノレン酸(6,9,12-オクタデカトリエン酸)、ジホモ- γ -リノレン酸(8,11,14-エイコサトリエン酸)、アラキドン酸(5,8,11,14-エイコサテトラエン酸)、7,10,13,16-ドコサテトラエン酸(22:4 $\omega 6$)及びDPA $\omega 6$ (4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸)を、炭素数が18以上で二重結合が2以上の $\omega 9$ 系高度不飽和脂

脂肪酸としては、6,9-オクタデカジエン酸、8,11-エイコサジエン酸、及びミード酸（5,8,11-エイコサトリエン酸）を、炭素数が18以上で二重結合が3以上の ω 3系高度不飽和脂肪酸として、 α -リノレン酸（9,12,15-オクタデカトリエン酸）、6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸（18:4 ω 3）、8,11,14,17-エイコサテトラエン酸（20:4 ω 3）、EPA（5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸）、DPA ω 3（7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸）、及びDHA（4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸）を挙げることができる。

【0037】

したがって、本発明においては、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物であればすべて使用することができる。例えば、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）の生産能を有する微生物としては、モルティエレラ（Mortierella）属、コニディオボラス（Conidiobolus）属、フィチウム（Pythium）属、フィトフトラ（Phytophthora）属、ペニシリウム（Penicillium）属、クロドスポリウム（Cladosporium）属、ムコール（Mucor）属、フザリウム（Fusarium）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、ロードトルラ（Rhodotorula）属、エントモフトラ（Entomophthora）属、エキノスポランジウム（Echinosporangium）属、サプロレグニア（Saprolegnia）属に属する微生物を挙げることができる。

【0038】

モルティエレラ（Mortierella）属モルティエレラ（Mortierella）亜属に属する微生物では、例えばモルティエレラ・エロンガタ（Mortierella elongata）、モルティエレラ・エキシグア（Mortierella exigua）、モルティエレラ・フィグロフィラ（Mortierella hygrophila）、モルティエレラ・アルピナ（Mortierella alpina）等を挙げることができる。具体的にはモルティエレラ・エロンガタ（Mortierella elongata）IF08570、モルティエレラ・エキシグア（Mortierella exigua）IF08571、モルティエレラ・フィグロフィラ（Mortierella hygrophila）IF05941、モルティエレラ・アルピナ（Mortierella alpina）IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等の菌株を挙げることができる。

【 0 0 3 9 】

例えば、DHAを産生しうる微生物として、クリプテコデニウム (Crypthecodeni
um) 属、スラウトキトリウム (Thrautochytrium) 属、シゾキトリウム (Schizoc
hytrium) 属、ウルケニア (Ulkenia) 属、ジャポノキトリウム (Japonochytrium
) 属又はハリフォトリス (Haliphthoros) 属に属する微生物を挙げることもでき
る。

【 0 0 4 0 】

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国の
アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Coll
ection, ATCC) 及び、Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなん
ら制限なく入手することができる。また本発明の研究グループが土壌から分離し
た菌株モルティエセラ・エロンガタSAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条
寄第1239号) を使用することもできる。

【 0 0 4 1 】

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の孢子、菌糸、又は予め
培養して得られた種培養液あるいは種培養より回収した菌体を、液体培地に接種
し本培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、
キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール
、マンニトール、糖化澱粉等の一般的に使用されているものが、いずれも使用で
きるが、これらに限られるものではない。

【 0 0 4 2 】

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、
コーンステープリカー、大豆タンパク、脱脂ダイズ、綿実カス等の天然窒素源
の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫
酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができるが、特に大豆から得られる
窒素源、具体的には大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから
、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に、脱脂大豆に熱変性を施したもの、より
好ましくは脱脂大豆を約70～90℃で熱処理し、さらにエタノール可溶成分を除去
したものを単独または複数で、あるいは前記窒素源と組み合わせて使用すること

ができる。

【0043】

この他必要に応じて、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン以外に、鉄、銅、亜鉛、マンガン、ニッケル、コバルト等の金属イオンやビタミン等を微量栄養源として使用できる。

これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上、一般に炭素源は総添加量は0.1~40重量%、好ましくは1~25重量%、窒素源の総添加量は2~15重量%、好ましくは2~10重量%とするのが望ましく、より好ましくは初発の炭素源添加量を1~5重量%、初発の窒素源添加量を3~8重量%として、培養途中に炭素源及び窒素源を、さらにより好ましくは炭素源のみを流加して培養する。

【0044】

なお、不飽和脂肪酸の収率を増加せしめるために、不飽和脂肪酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノール酸のごとき脂肪酸又はその塩、あるいは脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて使用できる。基質の添加量は培地に対して0.001~10%、好ましくは0.5~10%である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0045】

高度不飽和脂肪酸を産生する微生物の培養温度は使用する微生物によりことなるが、5~40℃、好ましくは20~30℃とし、また20~30℃にて培養して菌体を増殖せしめた後5~20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。このような温度管理によっても、生成脂肪酸中の高度不飽和脂肪酸の割合を上昇せしめることができる。種培養では通気攪拌培養、振盪培養、固体培養、又は静置液体培養を、本培養では通気攪拌培養を行う。本培養開始時（種培養液接種時）の培地pHは5~7、好ましくは5.5~6.5に調製する。本培養期間は、通常2~30日間、好ましくは5~20日間、より好ましくは5~15日間行う。

【0046】

本発明の油脂（粗油）は、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸としてなる油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物を培養し、その培養物から得られる微生物油脂であって、 $d/D=0.34\sim0.6$ の攪拌翼を装備した培養槽を用いて本培養するか、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽の場合はpH5以下で殺菌した窒素源を含む培地で本培養することにより、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させることを最大の特徴としている。したがって、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）を産生する微生物を用い、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させる方法を明らかにした。

【0047】

本培養方法として、攪拌翼直径(=d)、培養槽内径(=D)の比率が、 $d/D=0.30\sim0.6$ 、好ましくは $d/D=0.34\sim0.55$ 、より好ましくは $d/D=0.37\sim0.55$ 、最も好ましくは $d/D=0.42\sim0.55$ の培養槽を用いて培養を行なうことにより、粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させることを最大の特徴としている。また、比率 d/D によるより優れた効果を得るためには、容積が 1m^3 以上、好ましくは容積 5m^3 以上、より好ましくは容積 10m^3 以上の培養槽を用いることが望ましい。攪拌翼は、タービン翼をはじめとする攪拌翼を1段あるいは複数段で用いることができるがこれらに限定されるわけではない。

【0048】

培地pHの調製を培地殺菌の後に行なうためには、雑菌汚染を起こさないように無菌的に作業をしなければならないため、通常は培地殺菌の前に行なわれる。例えば、殺菌前後でpH変化が無い培地を用いて、培養開始時のpHを6.0に調製する場合には、殺菌前に非無菌作業でpHを6.0に調製すれば、殺菌後の無菌作業によるpH調製は不要である。 d/D が0.34未満の培養槽においてもエステル型ステロールを低減できる方法として、発明者らは、殺菌工程におけるpH条件が培養の生産性や生産物組成に影響を及ぼす可能性について着目し検討を重ねた結果、pH5以下に調製した培地を殺菌し、殺菌後に培養開始pHに再調製する方法が好ましいことを見出した。

【0049】

具体的には、培地窒素源を含む溶液をpH4~5、好ましくはpH4.2~4.7に調製した後、殺菌する。そして殺菌培地をそのままか、あるいは別殺菌する添加培地があればそれらを添加して培養開始培地を調製した後に、pH5~7に、好ましくはpH5.5~6.5に調製して、種培養液を接種して本培養を開始する。殺菌前の窒素源含有溶液のpHを調製する手段としては、硫酸、塩酸、リン酸、硝酸、炭酸あるいはこれらの塩を一つあるいは複数組み合わせたpH調整剤を添加するが特に制限しない。殺菌後の培地pHを再調製する手段としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの水酸化化合物や、アンモニアやアンモニウム塩などの一つあるいは複数組み合わせたpH調整剤を添加するが特に制限しない。

【0050】

モルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物は、アラキドン酸を主たる構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物として知られているが、本発明者らは、上記菌株に変異処理を施すことによって、ジホモγ-リノレン酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物（特開平5-91887）や、ω9系高度不飽和脂肪酸を主たる構成脂肪酸としてなる油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物を（特開平5-91888）得ている。

【0051】

さらに、高濃度の炭素源に耐性を有する微生物（W098/39468）も得ており、これら微生物は、モルティエレラ属モルティエレラ亜属の微生物であり、本発明の培養法、具体的には $d/D=0.34\sim0.6$ の攪拌翼を装備した培養槽を用いて本培養するか、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽の場合はpH5以下で殺菌した窒素源を含み、培地窒素源濃度2%~15%の培地で本培養することによって、容易に粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させることができる。

【0052】

しかし、本発明はモルティエレラ属モルティエレラ亜属に属する微生物に限定しているわけではなく、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）を産生しうる微生物に、本発明の培養法、具体的には $d/D=0.34\sim0.6$

の攪拌翼を装備した培養槽を用いて本培養するか、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽の場合は $pH5$ 以下で殺菌した窒素源を含み、培地窒素源濃度 $2\% \sim 15\%$ の培地で本培養する方法を適用して、目的とする不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させた粗油を得ることができる。

【0053】

$d/D=0.34 \sim 0.6$ の攪拌翼を装備した培養槽を用いて本培養するか、あるいは $d/D=0.34$ 未満の培養槽の場合は $pH5$ 以下で殺菌した窒素源を含み、培地窒素源濃度 $2\% \sim 15\%$ の培地で本培養することによって、不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下せしめた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂を菌体内に蓄積した微生物から、粗油を得る方法として、培養終了後、培養液をそのままかあるいは殺菌、濃縮、酸性化などの処理を施した後、自然沈降、遠心分離および／又は濾過などの常用の固液分離手段により培養菌体を得る。

【0054】

固液分離を助けるために、凝集剤や濾過助剤を添加してもよい。凝集剤としては、例えば、塩化アルミニウム、塩化カルシウム、アルギン、キトサンなどを使用できる。濾過助剤としては、例えば、珪藻土を使用できる。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾、流動層乾燥、凍結乾燥などによって行うことができる。乾燥菌体から粗油を得る手段としては、有機溶剤による抽出法や圧搾法を用いることができるが、好ましくは窒素気流下で有機溶剤によって抽出する。

【0055】

有機溶剤としてはエタノール、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル、アセトン等を用いることができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム－メタノール－水の一層系の溶媒も用いることができる。しかしながら、粗油の取得に用いる抽出法を上記の方法に限定しているわけではなく、菌体内の油脂を効率的に抽出する手法はすべて使用することができる。例えば、超臨界抽出法なども有効な手段として使用することができる。

【0056】

有機溶剤や超臨界流体で抽出された抽出物から減圧下などの条件下で有機溶剤や超臨界流体成分を除去することにより、目的とする粗油を得ることができる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール、アセトン等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

【0057】

本発明で得た不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下せしめた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る粗油は、動物飼料に配合して直接使用することができる。しかし、食品への適応を考えた場合、一般の油脂精製工程に供して使用することが望ましい。油脂精製工程として、脱ガム、脱酸、脱臭、脱色、カラム処理、分子蒸留、ウインタリングなどの常法の工程を用いることができる。したがって、常法の油脂精製工程で取り除くことの出来なかったエステル型ステロールを低下せしめた本発明の粗油を油脂精製工程に供することで、今までにない不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた精製油脂を得ることができる。

【0058】

さらに、エステル型ステロールを低下せしめた本発明の粗油を油脂精製工程に供することで、精製工程における工程負荷を下げることもできる。具体的には、例えば、精製工程における処理時間の短縮やエネルギーコストを削減しても、なおかつ従来と同等の不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量の精製油脂が得ることや、従来と同等の処理時間やエネルギーコストでありながら、今まで以上に不ケン化物及び／又はエステル型ステロール含量を低下させた精製油脂が得られることである。

【0059】

本発明の精製油脂（トリグリセリド）の用途に関しては無限の可能性があり、食品、飲料、化粧品、医薬品の原料並びに添加物として使用することができる。そして、その使用目的、使用量に関して何ら制限を受けるものではない。

例えば、食品組成物としては、一般食品の他、機能性食品、栄養補助食品、未

熟児用調製乳、成熟児用調製乳、乳児用調製乳、乳児用食品、妊産婦食品又は老人用食品等を挙げることができる。

【0060】

油脂を含む食品例として、肉、魚、またはナッツ等の本来油脂を含む天然食品、スープ等の調理時に油脂を加える食品、ドーナッツ等の熱媒体として油脂を用いる食品、バター等の油脂食品、クッキー等の加工時に油脂を加える加工食品、あるいはハードビスケット等の加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布する食品等が挙げられる。さらに、油脂を含まない、農産食品、醗酵食品、畜産食品、水産食品、または飲料に添加することができる。さらに、機能性食品・医薬品の形態であっても構わなく、例えば、経腸栄養剤、粉末、顆粒、トローチ、内服液、懸濁液、乳濁液、シロップ等の加工形態であってもよい。

【0061】

【実施例】

次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本発明は、実施例に限定されない。

実施例 1. アラキドン酸生産、 $d/D=0.34$ 、培地中大豆粉濃度6%

アラキドン酸生産菌として *Mortierella alpina* CBS754.68 を用いた。保存菌株を、酵母エキス 1%、グルコース 2%、pH6.3 の培地に接種し、往復振盪 100rpm、温度 28℃ の条件にて種培養（第一段階）を開始し、3日間培養した。次に、酵母エキス 1%、グルコース 2%、大豆油 0.1%、pH6.3 の培地 30L を 50L 容通気攪拌培養槽に調製し、これに種培養（第一段階）液を接種して、攪拌回転数 200rpm、温度 28℃、槽内圧 150kPa の条件にて、種培養（第二段階）を開始し、2日間培養した。

【0062】

次に、4500L の培地（培地 A：大豆粉 336kg、 KH_2PO_4 16.8kg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.8kg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.8kg、大豆油 5.6kg）、を条件 (1-1) では pH を 6.3 に調製して、条件 (1-2) では pH を 4.5 に調製して両条件とも、121℃、20 分の条件で滅菌した。別培地として、1000L の培地（培地 B：含水グルコース 112kg）を 140℃、40 秒の条件で滅菌して先の培地 A に加えて培地 C を調製した。培地 C を条件 (1-1) で

はpH無調製で、条件(1-2)ではpH6.3に調整した後、種培養液(第二段階)を接種して、計5600Lの初発培養液量(培養槽容積10kL)に合わせた。

【0063】

温度26℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPaで培養を開始した。培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率が $d/D=0.34$ の6枚羽根タービンを3段装備した培養槽を用いた。また、表1に示すように培地流加を行ない、306時間の本培養を行なった。培養終了時は、培地流加による増加分と蒸発による減少分の影響で、7750Lの培養液量となった。培養終了時の培養液当たりアラキドン酸生成濃度は条件(1-1)で18.2 g/L、条件(1-2)で18.4g/Lであった。

【0064】

【表1】

表1：実施例1の培地流加

本培養時間	流加培地
19時間後	含水グルコース280kg/460L
43時間後	含水グルコース280kg/450L
67時間後	含水グルコース252kg/390L
91時間後	含水グルコース252kg/410L
120時間後	含水グルコース224kg/370L
140時間後	含水グルコース168kg/280L
163時間後	含水グルコース168kg/270L

【0065】

培養終了後、120℃、20分の条件で殺菌した後、連続式脱水機で湿菌体を回収し、振動流動層乾燥機で水分含量1wt%まで乾燥し、空気輸送機を用いて充填場所に乾燥菌体を輸送した。得られた乾燥菌体を、容積約1m³のアルミパウチ製コンテナバッグに窒素ガスとともに充填し、バッグ口部をヒートシールシールした後、10℃以下の冷蔵庫で保管した。

コンテナバッグより取り出した乾燥菌体に、ヘキサン抽出を施し、ヘキサン溶液を濾過して含有固形分を除去した後、減圧下で加熱することによってヘキサンを除去し、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。粗油を分析した結果、表2に示すように、エステル型ステロール含量の低い粗油が得られた。

【0066】

【表2】

表2: アラキドン酸含有粗油の分析値

実施例	実施例1 条件1-1	実施例1 条件1-2
培養槽形状 d/D	0.34	0.34
培地A(殺菌前)のpH調製値	6.3	4.5
培地C(殺菌後、種培養液接種前)のpH値	6.3	6.3
各画分の重量%		
トリグリセリド	94.0%	94.2%
不けん化物	2.0%	1.8%
エステル型ステロール	0.8	0.6%
粗油の総脂肪酸中のアラキドン酸(%)	42.0%	42.1%

【0067】

実施例2. アラキドン酸生産、d/D=0.42、培地中大豆粉濃度6%

実施例1と同じ方法で種培養を行った。培養槽の形状としては、d/D=0.42の6枚羽根タービンを3段装着のタンクを使用し、培地調製時のpH条件を変更する場合は、全て実施例1-条件(1-1)と同じ条件で本培養を行った。条件(2-1)では培地A(殺菌前)のpH6.1調製かつ培地C(種培養液接種前)のpH無調製、条件(2-2)では培地AのpH4.5調製かつ培地CのpH6.1調製で各々培養した。培養の結果、培養終了時の培養液当たりアラキドン酸生成濃度は条件(2-1)で19.0 g/L、条件(2-2)で19.7 g/Lであった。培養終了後は、実施例1と同様の操作によって、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。粗油を分析した結果、表3に示すように、エステル型ステロール含量の低い粗油が得られた。

【0068】

【表 3】

表 3 : アラキドン酸含有粗油の分析値

実施例	実施例 2 条件2-1	実施例 2 条件2-2
培養槽形状 d/D	0.42	0.42
培地A(殺菌前)のpH調製値	6.1	4.5
培地C(殺菌後, 種培養液接種前)のpH値	6.1	6.1
各画分の重量%		
トリグリセリド	94.2%	93.5%
不けん化物	1.8%	1.6%
エステル型ステロール	0.6	0.5
粗油の総脂肪酸中のアラキドン酸 (%)	42.2%	41.3%

【0069】

実施例 3. アラキドン酸生産、 $d/D=0.3$, 0.25 , 0.2 、培地中大豆粉濃度6%

実施例 1 と同じ方法で種培養を行なった。培養槽形状としては、 $d/D=0.3$ の6枚羽根タービン2段装備のタンク、 $d/D=0.25$ の6枚羽根タービン2段装備のタンク、および $d/D=0.2$ の6枚羽根タービン2段装備のタンクを使用するほかは、全て実施例 1 の条件(1-1)と同じ条件で本培養を行った結果、培養終了時の培養液当たりアラキドン酸生成濃度は、 $d/D=0.30$ のタンクでは17.0 g/L、 $d/D=0.25$ のタンクでは16.5 g/L、 $d/D=0.2$ のタンクでは13.5 g/Lであった。培養終了後は実施例 1 と同様の操作によって、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。粗油を分析した結果、表 4 に示すように、エステル型ステロール含量は何れも1%を超えており、実施例 1 および実施例 2 との比較から、 d/D 比が小さい培養槽で培養したためと考えられた。

【0070】

【表 4】

表 4 : アラキドン酸含有粗油の分析値

実施例または対照例	実施例3 (対照例)	例3 (対照例)	例3 (対照例)
培養槽形状 d/D	0.30	0.25	0.20
培地A(殺菌前)のpH調製値	6.3	6.3	6.3
培地C(殺菌後, 種培養液接種前)のpH値	6.3	6.3	6.3
各画分の重量%			
トリグリセリド	93.8%	93.1%	93.0%
不けん化物	2.9%	2.9%	2.9%
エステル型ステロール	1.2%	1.2%	1.2%
粗油の総脂肪酸中のアラキドン酸(%)	42.0%	41.6%	41.5%

【0071】

実施例 4. アラキドン酸生産、d/D=0.3, 0.25, 0.2、培地中大豆粉濃度6%、
低pH殺菌

実施例 1 と同じ方法で種培養を行なった。本培養培地のpH調製は、実施例1の条件(1-2)と同様に行なった上で（培地 A のpH4.5→殺菌→培地 C のpH6.3）、d/D=0.3の6枚羽根タービン2段装備のタンク（条件4-1）、d/D=0.25の6枚羽根タービン2段装備のタンク（条件4-2）、およびd/D=0.2の6枚羽根タービン2段装備（条件4-3）の計3条件で、実施例 1 と同様の条件で本培養を行なった。これらに加えて、d/D=0.3のタンクで、培地 A の調製pHを4.0（条件4-4）、4.9（条件4-5）の2条件でも培養を行なった。

【0072】

本培養の結果、培養終了時の培養液当たりアラキドン酸生成濃度は、条件（4-1）[pH4.5殺菌, d/D=0.30]では17.2 g/L、条件（4-2）[pH4.5殺菌, d/D=0.25]では16.8 g/L、条件（4-3）[pH4.5殺菌, d/D=0.20]では14.0 g/L、条件（4-4）[pH 4.0殺菌, d/D=0.30]では17.1g/L、条件（4-5）[pH4.9殺菌, d/D=0.30]では17.2g/Lであった。培養終了後は実施例1と同様の操作によって、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。

【0073】

粗油の分析結果を表 5 に示す。d/D=0.30の培養槽を用いた場合、培地窒素源

をpH4.5で殺菌することによって、エステル型ステロール含量を1%以下に低減できたことが実施例3との比較から分かる。しかし、 $d/D=0.25$ 、 $d/D=0.20$ の培養槽の場合、窒素源をpH4.5で殺菌しても、エステル型ステロール含量は1%以下に低減することができなかった。また、条件(4-1)、(4-4)および(4-5)の比較より、窒素源の殺菌pHは4.0から4.9の範囲であれば、エステル型ステロールの低減効果は同等であると考えられた。

【0074】

【表 5】

表 5 : アラキドン酸含有粗油の分析値

実施例または対照例	実施例4 条件4-1	例4 条件4-2 (対照例)	例4 条件4-3 (対照例)	実施例4 条件4-4	実施例4 条件4-5
培養槽形状 d/D	0.30	0.25	0.20	0.30	0.30
培地A(殺菌前)のpH調整値	4.5	4.5	4.5	4.0	4.9
培地C(殺菌後, 種培養液接種前) のpH値	6.3	6.3	6.3	6.3	6.3
各画分の重量%					
トリグリセリド	93.8%	93.1%	93.0%	93.5%	93.4%
不けん化物	2.2%	2.5%	2.7%	2.1%	2.1%
エステル型ステロール	1.0%	1.1%	1.1%	1.0%	1.0%
粗油の総脂肪酸中のアラキドン 酸 (%)	42.0%	40.8%	40.8%	41.5%	41.7%

【0075】

実施例 5. 粗油を精製して得た精製油脂の分析結果

実施例 1-条件(1-1)及び実施例 2-条件(2-1)で得たアラキドン酸含有粗油を常法の脱酸、脱ガムにより精製し、精製油脂5-A及び5-Bを得た。実施例 3 の $d/D=0.25$ 条件で得たアラキドン酸含有粗油も同様に精製し、精製油脂5-Cを得た。得られたアラキドン酸含有精製油脂の分析値を表 6 に示す。

【0076】

【表6】

表6: 実施例5の分析結果 (アラキドン酸含有精製油脂A、B及びCの分析)

実施例または対照例	実施例1 (条件1-1)	実施例2 (条件2-1)	例3 (d/D=0.25) (対照例)
精製油脂	5-A	5-B	5-C
各成分の重量%			
トリグリセリド	96.0%	96.4%	95.0%
不けん化物	1.4%	1.2%	2.0%
エステル型ステロール	0.8%	0.6%	1.2%
精製油脂の総脂肪酸中のアラキドン酸(%)	42.4%	42.8%	41.7%

【0077】

実施例6. 大豆粉1.5%条件でのアラキドン酸生産

Mortierella alpina CBS754.68を用いて、実施例1と同じ方法で種培養（第一段階および第二段階）を行なった。次に、4500Lの培地（培地A：大豆粉84kg、K₂HPO₄ 16.8kg、MgCl₂・6H₂O 2.8kg、CaCl₂・2H₂O 2.8kg、大豆油 5.6kg）、を、121℃、20分の条件で滅菌した。別培地として、1000Lの培地（培地B：含水グル

コース112kg)を140℃、40秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。

【0078】

培地CをpH6.1に調整した後、種培養液(第二段階)を接種して、計5600Lの初発培養液量(培養槽容積10kL)に合わせた。温度26℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPaで本培養を開始した。本培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率がd/D=0.34の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽、およびd/D=0.25の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽を用いて、各々の培養槽で培養を行なった。また、表7に示すように培地流加を行ない、162時間の本培養を行なった。培養終了時の培養液当たりアラキドン酸生成濃度は、d/D=0.34のタンクで5.0g/L、d/D=0.25のタンクで4.7g/Lであった。

【0079】

【表7】

表7：実施例6の培地流加

本培養時間	流加培地
19 時間後	含水グルコース84kg/200L
43 時間後	含水グルコース84kg/200L
67 時間後	含水グルコース56kg/120L
91 時間後	含水グルコース56kg/125L

【0080】

培養終了後、実施例1と同様の方法で乾燥菌体を回収し、ヘキサン抽出によって、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。得られた粗油の分析値を表8に示す。培地窒素源1.5%の条件では、d/D=0.25、0.34の何れの条件でもエステル型ステロール含量1%以下の粗油が得られた。

【0081】

【表 8】

表 8：実施例 6 の結果（アラキドン酸含有粗油の分析値）

培養槽形状 d/D	0.25	0.34
各画分の重量%		
トリグリセリド	94.1%	93.0%
不けん化物	1.2%	1.2%
エステル型ステロール	0.4%	0.4%
粗油の総脂肪酸中のアラキドン酸 (%)	40.8%	41.5%

【0082】

実施例 7. ジホモ- γ -リノレン酸生産：d/D=0.30, 0.34, 0.25、培地中大豆粉濃度4%、窒素源殺菌pH4.5の影響

本発明者らは、ジホモ- γ -リノレン酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）の製造方法を確立している。特開平5-91887号公報の記載の方法にしたがって、アラキドン酸生産能を有し、かつ $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下した微生物[例えば、突然変異株モルティエラ・アルピナSAM1860（微工研菌寄第3589号）]を培養して得ることができる。

【0083】

ジホモ- γ -リノレン酸生産菌として *Mortierella alpina* SAM1860 を用いた。保存菌株を、酵母エキス 1 %、グルコース 2 %、pH6.3 の培地（100mL を 500mL 三角フラスコに調製）に接種し、往復振盪 100rpm、温度 28℃ の条件にて種培養（第一段階）を開始し、3 日間培養した。次に、酵母エキス 1 %、グルコース 2 %、大豆油 0.1 %、pH6.3 の培地 30L を 50L 容通気攪拌培養槽に調製し、これに種培養（第一段階）液を接種して、攪拌回転数 200rpm、温度 28℃、槽内圧 150kPa の条件にて、種培養（第二段階）を開始し、2 日間培養した。本培養は、条件 (7-1) ～ (7-4) の 4 水準で行なった。

【0084】

条件 (7-1) としては、4500L の培地（培地 A：大豆粉 224kg、KH₂PO₄ 16.8kg、MgCl₂ · 6H₂O 2.8kg、CaCl₂ · 2H₂O 2.8kg、大豆油 5.6kg）に水酸化ナトリウム水溶

液を添加してpHを6.1に調製した後121℃、20分の条件で滅菌した。別培地として、1000Lの培地（培地B：含水グルコース112kg）を140℃、40秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。培地CのpHを測定した結果pH6.1であった。培地Cに、種培養液（第二段階）を接種して、計5600Lの初発培養液量（培養槽容積10kL）に合わせた。温度26℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPaで培養を開始した。

【0085】

培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率が $d/D=0.34$ の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽を用いた。培養中の発泡は、消泡センサーで検知し、大豆油を自動添加することによって、発泡による培養液の槽外排出を防止した。また、表9に示すように培地流加を行ない、288時間の本培養を行なった。培養終了時は、培地流加による増加分と蒸発による減少分の影響で、7600Lの培養液量となった。

【0086】

条件(7-2)としては、培地Aに硫酸を非無菌操作で添加してpH4.5に調製し、培地Cに水酸化ナトリウム水溶液を無菌操作で添加してpHを6.1に調製し、 $d/D=0.3$ の培養槽を用いる他は条件(7-1)と同様の本培養条件で培養した。条件(7-3)は、 $d/D=0.30$ の培養槽を用いる他は条件(7-1)と同様の条件で培養を行なった。条件(7-4)は、 $d/D=0.25$ の培養槽を用いる他は条件(7-1)と同様の条件で培養を行なった。培養終了時の培養液当たりジホモ- γ -リノレン酸生成濃度は条件(7-1)、条件(7-2)ともに12.3g/Lであり、条件(7-3)では11.0g/L、条件(7-4)では10.0g/Lであった。

【0087】

【表 9】

表 9 : 実施例 7 の培地流加

本培養時間	流加培地
19 時間後	含水グルコース280kg/460L
43 時間後	含水グルコース280kg/450L
67 時間後	含水グルコース280kg/450L
120 時間後	含水グルコース336kg/530L

【0088】

培養終了後、120℃、20分の条件で殺菌した後、連続式脱水機で湿菌体を回収し、振動流動層乾燥機で水分含量1wt%まで乾燥し、空気輸送機を用いて充填場所に乾燥菌体を輸送した。得られた乾燥菌体を、容積約1m³のアルミパウチ製コンテナバッグに窒素ガスとともに充填し、バッグ口部をヒートシールシールした後、10℃以下の冷蔵室で保管した。

【0089】

コンテナバッグより取り出した乾燥菌体に、ヘキサン抽出を施し、ヘキサン溶液を濾過して含有固形分を除去した後、減圧下で加熱することによってヘキサンを除去し、ジホモ- γ -リノレン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。粗油を分析した結果を表10に示す。d/D=0.34の培養槽ではエステル型ステロール含量が1%以下の粗油が得られた。d/D=0.3の培養槽では、条件(7-3)のようにpH調製を従来法で行なうとエステル型ステロール含量の高い粗油が得られたが、条件(7-2)のように培地窒素源をpH4.5で殺菌するとエステル型ステロール含量が1%以下に低下した。d/D=0.25の培養槽では、エステル型ステロール含量が1%を上回った。

【0090】

【表10】

表10: ジホモ- γ -リノレン酸含有粗油の分析値

実施例または対照例	実施例7 条件7-1	実施例7 条件7-2	例7 条件7-3 (対照例)	例7 条件7-4 (対照例)
培養槽形状 d/D	0.34	0.30	0.30	0.25
培地A(殺菌前)のpH調製値	6.1	4.5	6.1	6.1
培地C(殺菌後、種培養液接種前)のpH値	6.1	6.1	6.1	6.1
各画分の重量%				
トリグリセリド	93.8%	94.1%	93.5%	93.0%
不けん化物	2.1%	2.2%	2.9%	2.9%
エステル型ステロール	0.9%	1.0%	1.2%	1.2%
粗油の総脂肪酸中のジホモ- γ -リノレン酸 (%)	42.2%	41.9%	40.7%	41.7%

【0091】

実施例8. ジホモ- γ -リノレン酸生産:大豆粉1.5%条件での培養

Mortierella alpina SAM1860を用いて、実施例7と同じ方法で種培養を行なった。次に、4500Lの培地（培地A：大豆粉84kg、 KH_2PO_4 16.8kg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.8kg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.8kg、大豆油 5.6kg）を、121℃、20分の条件で滅菌した。別培地として、1000Lの培地（培地B：含水グルコース112kg）を140℃、40秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。培地CをpH6.1に調整した

後、種培養液を接種して、計5600Lの初発培養液量（培養槽容積10kL）に合わせた。

【0092】

温度26℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPaで培養を開始した。培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率が $d/D=0.34$ の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽、および $d/D=0.25$ の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽を用いた。培養中の発泡は、消泡センサーで検知し、大豆油を自動添加することによって、発泡による培養液の槽外排出を防止した。また、表11に示すように培地流加を行ない、162時間の本培養を行なった。培養終了時の培養液当たりジホモ- γ -リノレン酸生成濃度は $d/D=0.34$ のタンクで4.8g/L、 $d/D=0.25$ のタンクで4.7g/Lであった。

【0093】

【表11】

表11：実施例8の培地流加

本培養時間	流加培地
19 時間後	含水グルコース84kg/200L
43 時間後	含水グルコース84kg/200L
67 時間後	含水グルコース84kg/120L
91 時間後	含水グルコース84kg/125L

【0094】

培養終了後、実施例7と同様の方法で乾燥菌体を回収し、ヘキサン抽出によって、ジホモ- γ -リノレン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。得られた粗油の分析値を表12に示す。

【0095】

【表 12】

表 12: 実施例 8 の結果 (ジホモ- γ -リノレン酸含有粗油の分析値)

培養槽形状 d/D	0.25	0.34
各画分の重量%		
トリグリセリド	93.5%	93.0%
不けん化物	1.2%	1.2%
エステル型ステロール	0.4%	0.4%
粗油の総脂肪酸中のジホモ- γ -リノレン酸 (%)	40.5%	41.3%

【0096】

実施例 9. ミード酸生産: d/D=0.5、培地中大豆粉濃度4%

本発明者らは、 ω 9系高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）の製造方法を確立している。特開平5-91888号公報の記載の方法にしたがって、 ω 9系高度不飽和脂肪酸生産能を有する微生物[例えば、突然変異株モルティエセラ・アルピナSAM1861（微工研菌寄第3590号）]を培養して得ることができる。

【0097】

さらに、ミード酸を構成脂肪酸として成る油脂（トリグリセリド）の製造方法も確立しており、特開平10-57085号公報に記載の方法にしたがって、アラキドン酸生産能を有する微生物に変異処理を施して得られる、 Δ 12不飽和化酵素が低下又は欠失し、かつ Δ 5不飽和化活性、 Δ 6不飽和化活性及び／又鎖延長活性の少なくとも一つが高められた変異株[例えば、モルティエセラ・アルピナSAM2086（8生寄文第1235号、FERMP-15766）]を培養して得ることができる。

【0098】

ミード酸生産菌として *Mortierella alpina* SAM2086 を用いた。保存菌株を、酵母エキス1%、グルコース2%、pH6.3の培地（培地500mLを2000mL三角フラスコに調製）に接種し、回転振盪100rpm、温度28℃の条件にて種培養（第一段階）を開始し、3日間培養した。次に、酵母エキス1%、グルコース2%、オリーブ油0.1%、pH6.3の培地30Lを50L容通気攪拌培養槽に調製し、これに種培

養（第一段階）液を接種して、攪拌回転数300rpm、温度28℃、槽内圧200kPaの条件にて、種培養（第二段階）を開始し、2日間培養した。次に、3200Lの培地（培地A：大豆粉160kg、オリーブ油 4kg、）を121℃、20分の条件で滅菌した。

【0099】

別培地として、700Lの培地（培地B：含水グルコース80kg）を140℃、90秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。培地CをpH6.1に調製した後、種培養液（第二段階）を接種して、計4000Lの初発培養液量（培養槽容積10kL）に合わせた。温度24℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPa、所要攪拌動力2kWで本培養を開始した。なお、培養4日目に温度を20℃にシフトした。培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率がd/D=0.5の6枚羽根タービンを2段装着した培養槽を用いた。また、表13に示すように培地流加を行ない、456時間の本培養を行なった。培養終了時の培養液当たりミード酸生成濃度は10.1 g/Lであった。

【0100】

【表13】

表13：実施例9の培地流加

本培養時間	流加培地
19 時間後	含水グルコース160kg/280L
43 時間後	含水グルコース160kg/280L
67 時間後	含水グルコース120kg/210L
91 時間後	含水グルコース120kg/210L
144 時間後	含水グルコース 80kg/140L

【0101】

培養終了後、120℃、20分の条件で殺菌した後、連続式脱水機で湿菌体を回収し、振動流動層乾燥機で水分含量1wt%まで乾燥し、空気輸送機を用いて充填型コンテナバックに窒素ガスとともに充填し、バッグ口部をヒートシールシールした後、10℃以下の冷蔵庫で保管した。

コンテナバックより取り出した乾燥菌体に、ヘキサン抽出を施し、ヘキサン溶液を濾過して含有固形分を除去した後、減圧下で加熱することによってヘキサン

を除去し、ミード酸含有粗油を得た。得られた粗油の分析結果を表14に示す。

【0102】

実施例10. ミード酸生産：d/D=0.25、培地中大豆粉濃度4%

実施例9と同じ方法で種培養を行った。培養槽形状としては、d/D=0.25の6枚羽根タービン2段装備のタンクを使用するほかは、全て実施例9と同じ条件で本培養を行った結果、培養終了時の培養液当たりミード酸生成濃度は8.0 g/Lであった。培養終了後、実施例9と同様の操作によって、ミード酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。

得られたミード酸含有粗油の分析値を表14に示す。

【0103】

【表14】

表14：ミード酸含有粗油の分析値

実施例または対照例	実施例9	例10 (対照例)
培養槽形状 d/D	0.5	0.25
各画分の重量%		
トリグリセリド	94.6%	93.0%
不けん化物	1.8%	2.8%
エステル型ステロール	0.6%	1.2%
粗油の総脂肪酸中のミード酸(%)	35.0%	30.6%

【0104】

実施例11. ミード酸生産、大豆粉1.5%条件での培養

Mortierella alpina SAM2086を用いて、実施例9と同じ方法で種培養を行なった。次に、3200Lの培地（培地A：大豆粉60kg、オリーブ油 4kg、）を121℃、20分の条件で滅菌した。別培地として、700Lの培地（培地B：含水グルコース80kg）を140℃、90秒の条件で滅菌して先の培地Aに加えて培地Cを調製した。培地CをpH6.1に調製した後、種培養液を接種して、計4000Lの初発培養液量（培養槽容積10kL）に合わせた。温度24℃、通気量49Nm³/hr、内圧200kPa、所要攪拌動力2kWで本培養を開始した。

【0105】

なお、培養4日目に温度を20℃にシフトした。培養槽の形状としては、槽内径(=D)と攪拌翼径(=d)の比率が $d/D=0.34$ の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽、および $d/D=0.25$ の6枚羽根タービンを2段装備した培養槽を用いた。また、表15に示すように培地流加を行ない、300時間の本培養を行なった。培養終了時の培養液当たりミード酸生成濃度は $d/D=0.34$ のタンクで3.9 g/L、 $d/D=0.25$ のタンクで3.8g/Lであった。

【0106】

【表15】

表15：実施例11の培地流加

本培養時間	流加培地
19 時間後	含水グルコース60kg/120L
43 時間後	含水グルコース60kg/120L
67 時間後	含水グルコース40kg/80L
91 時間後	含水グルコース40kg/80L

【0107】

培養終了後、実施例9と同様の方法で乾燥菌体を回収し、ヘキサン抽出によって、ミード酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。得られた粗油の分析値を表16に示す。

【0108】

【表16】

表16：実施例11の結果（ミード酸含有粗油の分析値）

培養槽形状 d/D	0.25	0.34
各画分の重量%		
トリグリセリド	95.0%	95.1%
不けん化物	1.3%	1.3%
エステル型ステロール	0.5%	0.5%
粗油の総脂肪酸中のミード酸(%)	34.5%	34.2%

【0109】

実施例 1 2. エステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂（トリグリセリド）配合カプセルの調製

ゼラチン100重量部及び食添グリセリン35重量部に水を加え50～60℃で溶解しゼラチン被膜を調製した。次に実施例 5 で得られたエステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂5-A（トリグリセリド）にビタミンE油0.05%を混合した内容物から、常法によりカプセル成形及び乾燥を行い、一粒180mgの内容物を含有するソフトカプセルを製造した。また、実施例 5 で得られた精製油脂5-Bを原料とするソフトカプセルも、精製油脂5-Aの場合と同様に製造した。

【0110】

実施例 1 3. 脂肪輸液剤への使用

実施例 5 で得られたエステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂5-A（トリグリセリド）400g、精製卵黄レシチン48g、オレイン酸20g、グリセリン100g及び0.1N 苛性ソーダ40mlを加え、ホモジナイザーで分散させたのち、注射用蒸留水を加えて4リットルとする。これを高圧噴霧式乳化機にて乳化し、脂質乳液を調製した。該脂質乳液を200mlずつプラスチック製バッグに分注したのち、121℃、20分間、高圧蒸気滅菌処理して脂肪輸液剤を製造した。また、実施例 5 で得られた精製油脂5-Bを原料とする脂肪輸液剤も、精製油脂5-Aの場合と同様に製造した。

【0111】

実施例 1 4. ジュースへの使用

β -シクロデキストリン2gを20%エタノール水溶液20mlに添加し、ここにスターラーで攪拌しながら、実施例 5 で得られたエステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂5-A（トリグリセリド）（ビタミンEを0.05%配合）100mgを加え、50℃で2時間インキュベートした。室温冷却（約1時間）後、さらに攪拌を続けながら4℃で10時間インキュベートした。

【0112】

生成した沈殿を、遠心分離により回収し、n-ヘキサンで洗浄後、凍結乾燥を行

い、アラキドン酸含有トリグリセリドを含有するシクロデキストリン包接化合物1.8gを得た。この粉末1gをジュース10Lに均一に混ぜ合わせ、エステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂（トリグリセリド）を含有するジュースを調製した。また、実施例5で得られた精製油脂5-Bを原料とするジュースも、精製油脂5-Aの場合と同様に調製した。

【0113】

実施例15. 粉ミルクへの使用

粉ミルク100gに、実施例5で得られたエステル型ステロールの低減化したアラキドン酸を構成脂肪酸とする精製油脂5-A（トリグリセリド）0.3gを混合することにより調製粉乳を調製した。また、実施例5で得られた精製油脂5-Bを原料とする調製粉乳も、精製油脂5-Aの場合と同様に調製した。

【0114】

実施例16. 種々の菌株を用いた培養法

アラキドン酸生産菌として Mortierella elongata IF08570、Mortierella hygrophila IF05941、Echinosporangium transversale NRRL3116、Conidiobolus nanodes CBS154.56、Saprolegnia lapponica CBS284.38を用いた。これらの保存菌株をそれぞれ、酵母エキス1%、グルコース2%、pH6.3の培地に接種し、往復振盪100rpm、温度28℃の条件にて種培養を3日間行った。

【0115】

次に、25Lの培地（グルコース500g、大豆粉775g、 KH_2PO_4 50g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.5g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.5g、大豆油 25g、pH6.3）を50L容通気攪拌培養槽に調製し、これに種培養液を接種して、攪拌回転数200rpm、温度28℃、槽内圧150kPaの条件にて本培養を開始した。培養槽の形状としては、 $d/D=0.42$ の6枚羽根タービンを用いた。グルコース濃度が1-2%程度になるように、約24時間ごとに50%グルコース溶液を添加しながら、186時間培養を行った。

【0116】

培養終了後、120℃、20分の条件で殺菌した。減圧濾過で湿菌体を回収し、水分含量1wt%まで乾燥した。得られた乾燥菌体に、ヘキサン抽出を施し、ヘキサン溶液を濾過して含有固形分を除去した後、減圧下で加熱することによってヘキサ

ンを除去し、アラキドン酸を構成脂肪酸として成る粗油を得た。

得られたアラキドン酸含有粗油の分析値を表17に示す。

【0117】

【表17】

表17：実施例16の結果（アラキドン酸含有粗油の分析値）

菌株	<u>M. elongat</u> <u>a</u> IF08570	<u>M. hygroph</u> <u>ila</u> IF0594 1	<u>E. transve</u> <u>rsale</u> NRRL 3116	<u>C. nanodes</u> CBS154.56	<u>S. lapponi</u> <u>ca</u> CBS284. 38
各画分の重量%					
トリグリセリド	90.0%	88.1%	86.0%	83.4%	82.6%
不けん化物	1.9%	1.9%	2.0%	2.0%	2.0%
エステル型	0.8%	0.7%	0.7%	0.8%	0.8%
ステロール					
粗油の総脂肪酸中のアラキドン酸 (%)	30.8%	31.7%	28.6%	26.3%	20.7%

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油及び精製油脂、並びにそれらの製造方法の提供。

【解決手段】 粗油中の不ケン化物及び／又はエステル型ステロールを低下させた高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする粗油の製造方法において、不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする油脂を産生しうる微生物を、窒素源濃度2～15%の培地で、攪拌翼直径(=d)と培養槽内径(D)との比率が $d/D=0.30\sim0.6$ である攪拌翼を装備した培養槽内で、培養することを特徴とする方法。

【選択図】 なし

特願2002-299199

出願人履歴情報

識別番号

[000001904]

1. 変更年月日

1990年 8月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

氏 名

サントリー株式会社